

早稲田大学大学院理工学研究科

# 博 士 論 文 概 要

## 論 文 題 目

アフリカツメガエルのエリスロポエチン  
受容体の構造と発現に関する研究

Structure and expression of  
erythropoietin receptor-like molecule  
in *Xenopus laevis*

申 請 者

会 沢 洋 一

Youichi Aizawa

生命理工学専攻 分子生理学研究

2004 年 12 月

造血システムは動物種全般に存在する生命の根幹の現象である。霊長類やげっ歯類の成体において、末梢血球数の恒常性に関与する成体型造血(二次造血)の主たる場(造血器)は骨髄である。骨髄にある造血幹細胞は増殖と分化を繰り返して成熟した血球となり、血液を循環する。血液前駆細胞の細胞膜上には、諸臓器で産生される造血因子が特異的に結合する受容体が発現しており、それらの結合によって細胞内のシグナル伝達系が作動し、細胞の増殖や分化が起こる。赤血球産生において中心的な役割を果たす造血因子は、赤血球産生因子 Erythropoietin (エリスロポエチン：EPO)と呼ばれる糖蛋白質である。ヒトの EPO は 1977 年に再生不良性貧血患者の尿から純化され、その遺伝子配列は 1985 年に明らかにされた。続いてヒトの EPO 受容体(EPOR)の遺伝子は 1989 年に単離され、赤血球造血の分子基盤が次第に明らかにされてきた。貧血によって血中酸素濃度が低下すると、これに応答して腎臓における EPO 産生が亢進し、やがて赤血球数が上昇して末梢赤血球数の恒常性が維持される。造血因子の遺伝子組換え体は、各種のヒト疾患治療薬として期待され、例えば EPO は既に臨床医薬として実用化された。このような背景により、造血研究の対象は霊長類やげっ歯類にほぼ限られており、他の生物種における造血の分子生理学的な知見の集積は乏しい。造血は多くの動物に共通した生命の基本システムである。また、幹細胞科学の興隆とともに、多様な生物種の造血系を解析し、造血制御の普遍性と多様性の理解を深耕する必要性が高まっている。胚体内の血球産生(一次造血)に関しては、哺乳類の他にも小型魚類や両生類における研究例は多いが、これらの二次造血研究は未知の領域として残されている。本研究では両生類 *Xenopus laevis*(アフリカツメガエル：ゼノパス)の成体を対象に、赤血球産生の責任因子である EPO と EPOR の同定を進め、赤血球造血の分子基盤の解明を行った。

第 1 章では、哺乳類における赤血球造血に関する知見を中心に、広く脊椎動物全般で解明されてきた造血研究の成果を概説している。そして赤血球産生における EPO と EPOR 分子の構造や作用をまとめ、本研究の位置づけを示している。

第 2 章では、ゼノパスの EPO 遺伝子のクローニングについて示している。ゼノパス成体を貧血にして低酸素症を誘導すれば、内因性の EPO 産生を亢進させることができる。そこで溶血剤フェニルヒドラジン(PHZ)をゼノパスに投与して貧血にし、EPO 産生臓器の候補となる腎臓、肝臓、脾臓から抽出した RNA から cDNA ライブラリを作製し、EPO cDNA のクローニングを試みた。プライマーとプローブは、マウス EPO cDNA および Expressed Sequence Tag (EST)データベースに見出されたゼブラフィッシュの EPO の相同遺伝子配列より設計した。しかし、この方法では、ゼノパス EPO の有力な候補遺伝子は見出せず、哺乳類とゼノパスの EPO の遺伝子配列の相同性は低いと推定された。最近報告されたフグの EPO 遺伝子配列も哺乳類 EPO の配列と相同性が低い。これらのことから、赤血球造血を担う EPO の遺伝子配列は、生物種間で高く保存されているわけで

はないといえた。

第3章では、ゼノパス EPOR cDNA のクローニングとその構造の解析について示している。PHZ 投与後のゼノパスでは、貧血回復期の末梢血中に幼若赤血球が出現する。このような分化段階が未熟な前駆細胞には EPOR が発現していると考えられた。そこでまず EPOR 遺伝子を得るために、ゼノパスの EST データベースを検索してヒト EPOR の相同配列を見出し、プライマーとプローブを設計した。次に幼若赤血球を密度勾配遠心法で分離して mRNA を抽出し、cDNA ライブラリを作製した。この cDNA ライブラリから、ゼノパス EPOR 候補遺伝子を複数得た。そのうち1種の塩基配列よりアミノ酸配列(一次構造)を決定し、*in silico* の諸解析を実施したところ、N 末端側シグナル配列と細胞膜貫通領域の存在が示され、本分子は哺乳類の EPOR と同様、1 回膜貫通型の分泌型膜蛋白質と推定された。また細胞外領域に複数のシステイン残基、WSXWS 配列、フィブロネクチン領域、さらに細胞内領域には Box1/2 領域、複数のチロシン残基などのサイトカイン受容体構造に特長的な機能領域を含んでいた。ここで本分子を xeEPOR と命名した。一方、ヒトおよびマウスの EPOR と xeEPOR の配列相同性は、塩基配列では 50% 以下、アミノ酸配列では 25% 以下であった。従って、xeEPOR が哺乳類の EPOR と同様に、赤血球産生に重要な生物学的機能をもつ分子であることを示す必要があると考えられ、以後、第4章～第6章で詳細な研究展開が示されている。

第4章では、第3章で得た xeEPOR の組織発現の局在性について示している。本分子が哺乳類の EPOR と相同的な機能をもつならば、赤血球前駆細胞に発現して末梢赤血球数の調節に関与するはずである。まずゼノパス成体における xeEPOR の組織発現分布をノーザンハイブリダイゼーション法で調べたところ、末梢血球に 5.8、4.1、0.6kb の3種類の mRNA の特異的な発現が確認された。そして幼若赤血球では、成熟赤血球に比べて 4.1、0.6kb の mRNA の発現量が増加していた。哺乳類の赤血球前駆細胞では EPO に対する反応性が異なる3種類の EPOR が存在し、細胞の分化成熟とともに存在比を変えることが報告されているが、ゼノパスの赤血球においても同様の可能性がある。次に赤血球系細胞における xeEPOR 発現の時期と部位を解析した。xeEPOR mRNA は、*in situ* ハイブリダイゼーション法によって赤血球系転写因子 GATA-1 を強く発現する幼若な赤血球の細胞質に発現が認められた。哺乳類では、GATA-1 は EPOR 遺伝子 5' 側上流プロモーター領域の認識配列に結合して EPOR の発現を制御し、また逆に EPOR は GATA-1 の発現を制御する。xeEPOR の 5' 非翻訳領域に GATA 結合配列が見出されたことから、xeEPOR mRNA の発現も GATA-1 により制御されている可能性がある。さらに xeEPOR 蛋白質の細胞外領域を抗原にして、抗 xeEPOR ポリクローナルウサギ抗体を作製し、免疫細胞染色法で xeEPOR 蛋白質の分布を調べたところ、幼若赤血球の細胞膜表面に局在が認められた。以上の発現解析により、xeEPOR は成体組織における赤血球系細胞の細胞膜に発現し、赤血球産生に重要

な受容体として機能している可能性が示された。

第 5 章では、ゼノパスの個体発生における **xeEPOR** の血球発現の変化を示している。両生類の造血は胚発生時に腹部血島領域で起こる一次造血から始まり、**xeEPOR** の血球における発現量は血島の形成とともに上昇すると考えられる。このことを明らかにするために、各発生段階の胚から RNA を抽出し、RT-PCR 法による発現解析を行った。その結果、血島の形成が開始される第 28 発生段階以降、**GATA-1** の発現の後に **xeEPOR** の発現量は上昇し、その後も発現量は維持された。この結果は、一次造血から二次造血に至るまでの赤血球形成の各段階で、**xeEPOR** の発現は、**GATA-1** による転写制御を受けることを示唆した。

第 6 章では、赤血球産生における **xeEPOR** の生物学的機能を *in vivo* 実験によって実証したことを示している。**xeEPOR** が赤血球前駆細胞の増殖と分化を刺激する作用をもつならば、**xeEPOR** の細胞外領域(可溶型 **EPOR**)をゼノパスに投与すれば、内因性の **EPO** がこれと結合して **EPO** 活性を中和し、赤血球造血は抑制されると考えた。そこで可溶型 **xeEPOR** を大腸菌で発現させ、精製標品を成体のゼノパスに連続心投与した。可溶型 **xeEPOR** 投与後、末梢赤血球数は緩慢に減少した。その極小期は投与 16 日後であり、**PHZ** 投与急性貧血の例(第 2、3 章)に比べて大幅に遅延した。投与 16 日以降の赤血球数回復期には、**PHZ** 処理後の貧血回復時に見られたときと同様、新生幼若赤血球が数多く出現した。このとき白血球数、栓球数の経時変化は認められなかった。以上のことから、可溶型 **xeEPOR** の標的細胞は血球系統に特異的であり、第 4 章の組織発現分布の知見と矛盾することなく未熟な赤血球前駆細胞であること、また **xeEPOR** は赤血球造血において重要な機能分子である、と結論した。

第 7 章では、本研究の成果を総括して考察し、今後の展望を示している。

以上をまとめると、本研究は、赤血球造血を担う **EPOR** 遺伝子をゼノパス成体より取得し、哺乳類以外で初めてその遺伝子配列、蛋白質の一次構造、組織発現分布を明らかにした。さらに **EPO-EPOR** 系による赤血球産生調節機構がゼノパスにおいても存在することを *in vivo* の実験モデルにて詳細に実証した。多くの生物種の造血制御系はこれまでにほとんど調べられておらず、本研究で得られた両生類における知見や成果は、生物学、血液学の領域で新たな視点を示すものであり、基礎生物学のみならず、現在急速に発展しつつある臓器・組織再生や幹細胞の研究領域の新しいモデル系としても貢献するものである。

# 研 究 業 績

| 種 類 別 | 題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者(申請者含む)   |
|-------|--|
| 論文    | <p>○ (1) Expression of erythropoietin receptor-like molecule in <i>Xenopus laevis</i> and the development of anemia by the administration of its recombinant soluble form.<br/><i>Blood</i>, (投稿中).<br/><b>Youichi Aizawa</b>, Nami Nogawa, Nobuyoshi Kosaka, Yasutaka Maeda, Takafumi Watanabe, Takahiro Ochiya, Takashi Kato</p> <p>○ (2) Cloning of complimentary deoxyribunucleic acid encoding follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone beta subunit precursor molecules in Reeves's turtle (<i>Geoclemys reevesii</i>) and Japanese grass lizard (<i>Takydromus tachydromoides</i>).<br/><i>General and Comparative Endocrinology</i>, 2003;132(3):465-73.<br/><b>Youichi Aizawa</b>, Susumu Ishii</p> <p>○ (3) Cloning of complimentary deoxyribonucleic acid encoding the beta subunit precursor molecules in the Reeves's turtle, <i>Geoclemys reevesii</i>.<br/>In: J.Y.L. Yu (Ed.), <i>Recent Advances in Comparative Endocrinology. Proceedings of 4<sup>th</sup> Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology</i>, 2001:459-462.<br/><b>Youichi Aizawa</b>, Motoshi Kikuchi, Susumu Ishii</p> |
| 講演    | <p>(1) Expression of erythropoietin receptor-like molecule in <i>Xenopus laevis</i> and the development of anemia by the administration of its recombinant soluble form.<br/>46th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, California, USA, Dec, 2004.<br/><b>Youichi Aizawa</b>, Nami Nogawa, Nobuyoshi Kosaka, Yasutaka Maeda, Takafumi Watanabe, Hiroshi Miyazaki, Takahiro Ochiya, Takashi Kato</p> <p>(2) The development of anemia by the administration of soluble erythropoietin receptor homologue in <i>Xenopus</i>.<br/>第 77 回 日本生化学会大会 (横浜) 2004 年 10 月<br/>会沢 洋一、野川 菜美、小坂 展慶、前田 康隆、渡辺 隆文、落谷 孝広、加藤 尚志</p> <p>(3) 爬虫類の生殖腺刺激ホルモンα鎖 cDNA の構造と系統進化学的考察<br/>第 54 回 日本動物学会関東支部大会 (新宿) 2002 年 3 月<br/>会沢 洋一、石居 進</p>  |

|            |  |
|------------|--|
| <p>その他</p> | <p>(4) Cloning of complimentary deoxyribonucleic acid encoding the beta subunit precursor molecules of pituitary glycoprotein hormones in the Reeves's turtle, <i>Geoclemys reevesii</i>.<br/>14th International Congress of Comparative Endocrinology, Sorrento, Italy, May, 2001.<br/><b>Youichi Aizawa</b>, Susumu Ishii</p> <p>(5) クサガメ (<i>Geoclemys reevesii</i>) の生殖腺刺激ホルモンβサブユニット (FSHβ、LHβ); cDNA 塩基配列とアミノ酸配列:ウズラとの比較を中心として<br/>第 26 回 鳥類内分泌研究会 (鴨川) 2000 年 11 月<br/>会沢 洋一、菊地 元史、石居 進</p> <p>(6) Cloning of complimentary deoxyribonucleic acid encoding the beta subunit precursor molecules of gonadotropins in the Reeves's turtle, <i>Geoclemys reevesii</i>.<br/>4th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Taipei, May 2000.<br/><b>Youichi Aizawa</b>, Motoshi Kikuchi, Susumu Ishii</p> <p>(1) Evaluation of alteration in peripheral blood cell counts in adult <i>Xenopus laevis</i> responding to hematopoietic growth factors.<br/>第 76 回 日本生化学会大会 (横浜) 2003 年 10 月<br/>野川 菜美、平賀 信幸、会沢 洋一、池淵 研二、宮崎 洋、加藤 尚志</p> |
|------------|--|